Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 1, Apr. May. 2022, p. 151- 163

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۱ ص.۱۶۳-۱۵۱

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Green synthesis of silver nanoparticles using *Callistemon citrinus* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity

Zohreh Sosani Gharibvand[1], Behrooz Alizadeh Behbahani[2*], Mohammad Noshad[3], Hossein Jooyandeh[4]

Received: 2021.01.09
Accepted: 2021.04.20

How to cite this article:
Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., Jooyandeh. H., (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using *Callistemon citrinus* leaf extract and evaluation of its antibacterial activity. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18*(1), 151-163.

Abstract

Introduction: Nowadays, production and utilization of Nano materials have increased due to their unique and interesting properties. So far, different physical and chemical methods have been used to synthesize silver nanoparticles. Chemical synthesis is not compatible due to the hazardous chemicals residues on the surface of the nanoparticles (NP) as well as production of by products with high impact on the environment. Physical routes for synthesis of NPs have some drawbacks, too. These methods require high energy and space, and are expensive. Therefore, biological methods for the synthesis of silver nanoparticles are considered emerging technologies as economic choices in the green chemistry field. Among these methods, plant-mediated synthesis of AgNPs is a rapid, simple, non-toxic and eco-friendly technique. Silver nanoparticles exhibit high bactericidal activity at their utilized concentrations with no toxic effect on human cells, and they also strongly enhance the antibacterial activity of conventional antibiotics even against multi-resistant bacteria through their synergistic effects. *Callistemon citrinus* belongs to the family Myrtaceae and includes more than 30 species. The plant is widespread in wet tropics, notably Australia, South America and tropical Asia, but presently can be found all over the world. *Callistemon citrinus* is a potential medicinal plant used to treat gastrointestinal distress, pain, and infectious diseases caused by bacteria, fungi, viruses, and parasites. In this study *Callistemon citrinus* aqueous extract was used to reduce silver ions in silver nitrate solution. In the following, the antimicrobial activity of nanoparticles synthesized by various qualitative and quantitative methods on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi and Listeria innocua* was investigated.

Materials and Methods: For the synthesis of silver nanoparticles, 25 mL of silver nitrate solution was added to 5 mL of leaf extract with a concentration of 100 mg/mL and maintained for 24 h at 20 °C. Change the color of the solution to Red represents the production of silver nanoparticles in the solution. To stabilize the presence of silver nanoparticles, the absorption spectrum of silver nanoparticles produced by spectrophotometer was prepared. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using *Callistemon citrinus* leaf aqueous extract was examined by disc diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration (microdilution broth) and minimum bactericidal concentration on *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi and Listeria innocua*.

Results and Discussion: The results showed that in disc diffusion agar method, the diameter inhibition zone increased with increasing the concentration of silver nanoparticles. The maximum effect of silver nanoparticles synthesized using *Callistemon citrinus* leaf aqueous extract at a concentration of 150 mg / ml was observed for *Pseudomonas aeruginosa*. An inhibition zone was observed for all examined pathogenic microorganisms at all concentrations. The results showed that in the well diffusion agar method, nanosilver particles at a concentration of 18.75 mg/ml did not show any inhibitory effect on all the pathogenic microorganisms. The results of statistical analysis showed that there was no significant difference between all the concentrations of silver nanoparticles synthesized for *Escherichia coli, Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus* ($P< 0.05$). The MIC for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

1, 2, 3 and 4. MSc. Student, Assistant Professor, Associate Professor and Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(Corresponding Author E-mail: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68173.1008

Salmonella typhimurium and *Listeria innocua* was 128, 256, 256, 256 and 512 mg/mm, respectively. The MBC for all the pathogenic strains was 512 mg/mm. The results of this study showed that the *Callistemon citrinus* leaf extract has a good ability to synthesize silver nanoparticles. Nanoparticles synthesized from *Callistemon citrinus* leaf extract had good antimicrobial activity against examined pathogenic bacteria, especially Gram-negative bacteria. Green-synthesized nanoparticles can be used as antimicrobial agent to fight infectious diseases caused by various microbial strains, although more research is needed in vitro, animal models and in vivo.

Keywords: Aqueous extract, *Callistemon citrinus* leaf, Silver nanoparticles, Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 1, Apr. May. 2022, p. 151-163

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۱ ص.۱۶۳-۱۵۱

مقاله علمی-پژوهشی

سنتز سبز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه شیشه‌شور(*Callistemon citrinus*) و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی آن

زهره سوسنی غریبوند[1]- بهروز علیزاده بهبهانی[2]*- محمد نوشاد[3]- حسین جوینده[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۳۱

چکیده

امروزه تمایل به تولید و استفاده از مواد با ابعاد نانومتری با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد و جالب این مواد روز به روز در حال افزایش است. تاکنون روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی جهت سنتز نانو ذرات نقره مورد استفاده قرار گرفته است اما استفاده از گیاهان جهت سنتز نانو ذرات نقره بسیار سریع، ساده، غیرسمی و سازگار با محیط زیست است. در این پژوهش، عصاره آبی برگ گیاه شیشه‌شور جهت سنتز زیستی نانو ذرات نقره مورد استفاده قرار گرفت. رنگ محلول نیترات نقره پس از افزودن عصاره به رنگ مایل به قرمز تغییر رنگ داد. فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره علیه باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* و باکتری‌های گرم منفی *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی* با روش‌های انتشار در دیسک، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *لیستریا اینوکوا* به‌ترتیب ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشندگی نانو ذرات نقره برای تمامی باکتری‌ها بزرگتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. قطر هاله عدم رشد برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (حساس‌ترین سویه) در روش‌های انتشار در دیسک و چاهک آگار در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۱۳ و ۷/۷۵ میلی‌متر بود. در حالی که قطر هاله عدم رشد برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (مقاوم‌ترین سویه) در روش‌های انتشار در دیسک و چاهک آگار در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب ۸ و ۶/۷۵ میلی‌متر بود. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ گیاه شیشه‌شور قادر به سنتز نانو ذرات نقره می‌باشد و نانو ذرات سنتزی فعالیت ضدمیکروبی مناسبی بر سویه‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: عصاره آبی، برگ شیشه‌شور، نانو ذرات نقره، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی.

مقدمه

امروزه فناوری نانو با طیف گسترده‌ای از کاربردهای خود در جنبه‌های مختلفی از زندگی مدرن امروزی مانند زیست‌پزشکی، کشاورزی، مواد غذایی و الکترونیک مورد استفاده قرار گرفته است (Ahluwalia *et al.*, 2018). علم نانو، عمدتا بر پایه نانو ذرات استوار است. نانو ذرات، موادی با اندازه ۱ تا ۱۰۰ نانومتر و ساختار سه‌بعدی می‌باشند که از اشکال و اندازه مختلفی مانند بلوری، کروی، سوزنی، بی‌شکل و ... برخوردار می‌باشند (Nikbakht; Emrani *et al.*, 2018 and Pourali., 2015). نانو ذرات نقره[5] در میان تمام نانو ذرات فلزی به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص مانند هدایت الکتریکی و حرارتی بالا، خواص نوری و الکتریکی، فعالیت کاتالیزوری بالا، پایداری شیمیایی و خواص ضدمیکروبی مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند (Rafique *et al.*, 2019; Rasheed *et al.*, 2017). نانو ذرات نقره دارای خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Singh *et al.*, 2015; Dousti *et al.*, 2019;). نانو ذرات نقره فعالیت ضدمیکروبی بالایی را در غلظت‌هایی که هیچ‌گونه سمیتی برای سلول‌های انسانی ندارد، از خود نشان می‌دهند. از طرفی می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی آنتی‌بیوتیک‌های معمولی را از طریق اثرات هم افزایی در برابر باکتری‌های مقاوم افزایش دهند (Panacek *et al.*, 2018). از خاصیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره در ساخت نسل جدیدی از داروهای ضدمیکروبی و بالابردن ایمنی در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود. همچنین از نانو ذرات نقره به همراه آنتی‌بیوتیک جهت جلوگیری از عفونت استفاده می‌شود (Dehghan Nayeri *et al.*, 2018؛ Pirtarighat *et al.*, 2019).

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(* ایمیل نویسنده مسئول: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.68173.1008
5 Silver nano particles

تاکنون روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی جهت سنتز نانو ذرات نقره مورد استفاده قرار گرفته است (Abbasi *et al*., 2016). سنتز شیمیایی، به دلیل باقی ماندن مواد شیمیایی خطرناک بر سطح نانو ذرات و نیز تولید فرآورده‌های جانبی با محیط زیست سازگار نمی‌باشد. روش فیزیکی جهت سنتز نانو ذرات نقره نیز دارای اشکالاتی می‌باشد که از آن‌ها می‌توان به نیاز به انرژی، فضا و هزینه بالا اشاره کرد (Pirtarighat *et al*., 2019). از این رو، روش‌های بیولوژیکی جهت سنتز نانو ذرات نقره به‌عنوان گزینه‌ای اقتصادی و مقرون به صرفه در زمینه شیمی سبز در حال ظهور است (Rolim *et al*., 2019). در این میان، سنتز نانو ذرات نقره توسط گیاهان بسیار سریع، ساده، قابل اعتماد، غیرسمی و سازگار با محیط زیست است (Rajeshkumar *et al*., 2017). مزیت استفاده از عصاره گیاهان جهت سنتز نانو ذرات، حضور مولکول‌های زیستی مختلف مانند فلاونوئید[1]، ترپنوئید[2]، ساپونین[3] و ... در آن‌ها می‌باشد که می‌توانند به‌عنوان حامل‌های زیست محیطی عمل کنند و به‌طور موثری جهت درمان بیماری‌های مختلف انسان به‌کار برده شوند (Mahadevan *et al*., 2017; Ahluwalia *et al*., 2018).

گیاه شیشه‌شور با نام علمی *Callistemon citrinus* متعلق به خانواده Myrtaceae می‌باشد و شامل بیش از ۳۰ گونه است (Balasundaram *et al*., 2016). این گیاه در مناطق گرمسیری مرطوب به‌ویژه استرالیا، آمریکای جنوبی و نواحی گرمسیری آسیا به‌طور وسیع گسترش یافته اما امروزه در سراسر جهان یافت می‌شود (Mabhiza *et al*., 2016). گیاه شیشه‌شور، گیاه دارویی بالقوه‌ای می‌باشد که جهت معالجه بیماری‌های دستگاه گوارش و درد و بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری، قارچ، ویروس و انگل مورد استفاده قرار می‌گیرد. از عصاره این گیاه جهت درمان برونشیت و مشکلات تنفسی مانند سرفه استفاده می‌شود. گزارش‌ها نشان می‌دهد این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشد (Larayetan *et al*., 2019).

از آنجایی که گیاهان به‌عنوان منابع مناسبی جهت سنتز نانو ذرات نقره محسوب می‌شوند بنابراین در این پژوهش، از عصاره آبی برگ گیاه شیشه‌شور جهت احیای یون‌های نقره موجود در محلول نیترات نقره، استفاده گردید، در ادامه فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده به روش‌های متنوع کیفی و کمی بر باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی*، *لیستریا اینوکوا* مورد بررسی قرار گرفت.

1 Flavonoids
2 Terpenoid
3 Saponin
4 Silver nitrate

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی برگ گیاه شیشه‌شور

برگ‌های تازه گیاه شیشه‌شور در خرداد ماه ۱۳۹۸ از محوطه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جمع‌آوری شد. تایید اسم علمی گیاه توسط مرکز هرباریوم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان (کد هرباریوم KHAU302) انجام پذیرفت. عصاره آبی برگ شیشه شور مطابق با مطالعه سوسنی غریبوند و همکاران (۱۳۹۹)، تهیه شد.

تهیه مواد مواد مصرفی

در این پژوهش نیترات نقره[4] و محیط‌های کشت مولر هینتون آگار[5] و مولر هینتون براث[6] از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. دیسک بلانک (پادتن طب)، توئین ۸۰ (مرک آلمان)، دی‌متیل سولفوکساید[7] (مرک آلمان) و تری‌فنیل تترازولیوم کلراید[8] (سیگما-آلدریچ) با درجه آزمایشگاهی تهیه شدند.

تهیه سویه‌های میکروبی

جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره که توسط عصاره برگ گیاه شیشه‌شور سنتز شدند از پنج سویه باکتری بیماری‌زا *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Escherichia coli* ATCC 25992، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Listeria innocua* ATCC 33090 و *Salmonella typhi* PTCC 1609 استفاده شد.

تهیه استاندارد نیم مک فارلند

ابتدا تمامی سویه‌های میکروبی در محیط کشت مولر هینتون آگار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و سپس سوسپانسیون باکتریایی برابر با کدورت ۰/۵ مک فارلند از آن‌ها تهیه شد (۱/۵× ۱۰^۸ CFU/ml) (Dolatabadi *et al*., 2017; Sureshjani *et al*., 2014; Alizadeh Behbahani *et al*., 2016a,b; Alghooneh *et al*., 2015).

بیوسنتز سبز نانو ذرات نقره از عصاره برگ گیاه شیشه‌شور

جهت سنتز نانو ذرات نقره، ۲۵ میلی‌لیتر محلول نیترات نقره (مرک، آلمان) را با غلظت ۱ میلی‌مولار به ۵ میلی‌لیتر عصاره برگ با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده و جهت انجام واکنش به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه نگهداری شد (Karamian *et al*., 2019).

5 Mueller hinton agar
6 Mueller hinton broth
7 Dimethyl sulfoxide
8 Triphenyltetrazolium chloride

تغییر رنگ محلول به رنگ مایل به قرمز نشان‌دهنده تولید نانو ذرات نقره در محلول می‌باشد (Emrani *et al*., 2018).

آنالیز طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش

جهت تثبیت وجود نانو ذرات نقره، طیف جذبی نانو ذرات نقره تولید شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر تهیه شد. جهت انجام این کار، در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری انجام شد و قبل از خشک شدن نمونه در محدوده ۴۲۰ تا ۴۵۰ نانومتر جذب نمونه قرائت شد. این محدوده طول موج مربوط به عنصر نقره است و بسته به شکل و اندازه نانو ذرات در طیف وسیعی نوسان مشاهده شد (Karamian *et al*., 2019).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره انتشار در آگار به کمک دیسک

جهت انجام این آزمون ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شده از قبل، کشت داده شد. دیسک‌های کاغذی با غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره آغشته شد و با فواصل معینی در سطح محیط کشت قرار داده شدند. در نهایت پلیت‌های تلقیح شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Dehghan Nayeri *et al*., 2018; Rasheed *et al*., 2017; Alizadeh Behbahani *et al*., 2013).

انتشار در آگار به کمک چاهک

در روش چاهک آگار، ابتدا چاهک‌هایی به عمق ۶ میلی‌متر روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد. سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند روی سطح محیط کشت به‌صورت متراکم پخش شد. ۵۰ میکرولیتر از نانو ذرات سنتز شده با غلظت‌های ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر درون چاهک‌ها ریخته شد. در نهایت پتری‌دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها با خط‌کش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019; Gomathi *et al*., 2017).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC[1]) و حداقل غلظت باکتری‌کش (MBC[2]) نانو ذرات نقره

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از پلیت ۹۶ خانه استریل و روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. جهت انجام این آزمون ابتدا غلظت‌های سریالی از نانو ذرات نقره (۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، تهیه شد و سپس از هر غلظت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به داخل خانه‌های میکروپلیت ریخته و پس از آن ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند به هر خانه میکروپلیت اضافه شد. محیط کشت بدون تلقیح باکتری به‌عنوان شاهد منفی و محیط کشت همراه با باکتری و بدون تلقیح نانو ذرات به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در ادامه میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از گرمخانه‌گذاری ۱۰ میکرولیتر از محلول تری‌فنیل تترازولیوم کلراید با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به خانه‌های میکروپلیت افزوده شد. اولین چاهکی که هیچ‌گونه رشد باکتری در آن مشاهده نشد (تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نشد) به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد (Kiarsi *et al*., 2020; Haji Rostamloo *et al*., 2019; Emrani *et al*., 2018; Yeganegi *et al*., 2018).

حداقل غلظت کشندگی نانو ذرات نقره با توجه به نتایج به‌دست آمده از حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد در آزمون قبل تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت حداقل غلظت مهارکنندگی (چاهک‌هایی که باکتری در آن رشد نکرده بود) و غلظت‌های بیشتر از حداقل غلظت مهارکنندگی درون محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و سپس پتری دیش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. اولین غلظتی از نانوذره که مانع از رشد ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها شد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Dousti *et al*., 2019 ; Nayak *et al*., 2016).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ جهت آنالیز نتایج استفاده گردید. نتایج به‌صورت انحراف معیار± میانگین سه تکرار گزارش شدند و از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی دانکن برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

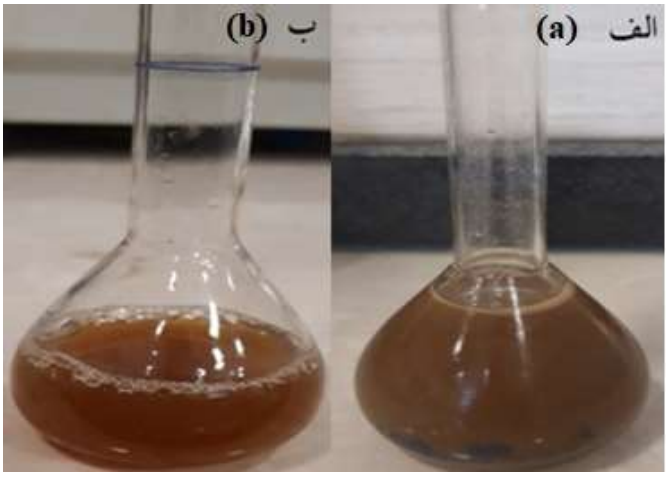
بررسی بیوسنتز نانو ذرات نقره و طیف سنجی مرئی-فرابنفش

احیای یون‌های نقره به نانو ذرات نقره با تغییر رنگ محلول و طیف‌سنجی انجام شد. رنگ محلول پس از اضافه شدن محلول نیترات نقره به عصاره گیاهی به رنگ مایل به قرمز تغییر نمود. این تغییر رنگ نشان‌دهنده احیای نیترات نقره و تشکیل نانو ذرات نقره در محلول می‌باشد. شکل ۱، تایید سنتز نانو ذرات نقره با تغییر رنگ محلول را نشان داده است. در این مطالعه احیای زیستی یون نقره به نانو ذرات نقره توسط طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش و پس از رقت‌سازی نمونه با

1 Minimum inhibitory concentration

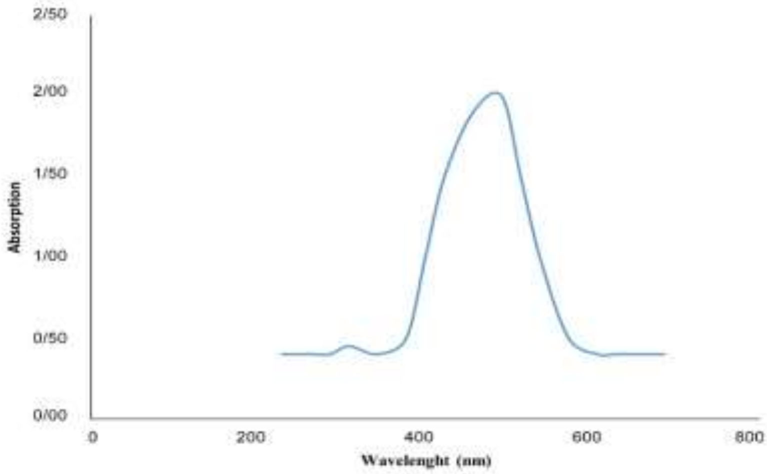
2 Minimum bactericidal concentration

آب دیونیزه کنترل شد. پیک جذبی نانو ذرات نقره حدوداً در طول موج ۴۳۰ نانومتر می‌باشد که بسته به شرایط و سایز ذرات، محل پیک جذبی تغییر می‌کند. طیف مرئی- فرابنفش نانو ذرات سنتز شده در شکل ۲، نشان داده شده است.



شکل ۱- تایید نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ گیاه شیشه‌شور الف) عصاره برگ ب) عصاره تیمارشده با نیترات نقره.

Fig. 1. Confirmation of nanoparticles synthesized from Callistemon citrinus leaf extract a) Leaf extract b) Extract treated with silver nitrate.



شکل ۲- طیف سنجی UV-vis نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ گیاه شیشه‌شور در محدوده طول موج ۶۰۰-۲۰۰ نانومتر.

Fig. 2. UV-vis spectrum of nanoparticles synthesized from the Callistemon citrinus leaf extract in the wavelength range of 200-600nm.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ گیاه شیشه‌شور

نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ گیاه شیشه‌شور به روش انتشار در دیسک بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نانو ذرات نقره قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا کرد. بیشترین تاثیر نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ شیشه‌شور در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد.

در تمامی غلظت‌های مورد بررسی هاله بازدارندگی برای تمامی سویه-های بیماری‌زا مشاهده شد. مقایسه آماری دوتایی میان غلظت‌های مختلف نانو ذرات سنتزی برای باکتری *اشرشیاکلی* نشان داد که غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با سایر غلظت‌ها (۱۸/۷۵، ۳۷/۵ و ۷۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد دارد اما میان غلظت‌های ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و همچنین غلظت‌های ۱۸/۷۵ و ۳۵/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد میان غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و

همچنین ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نانو ذرات نقره بیوسنتزی برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد وجود داشت در حالی که میان غلظت‌های ۱۸/۷۵ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد که برای باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* در سطح آماری ۵ درصد میان غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری وجود دارد در حالی که میان غلظت‌های ۱۸/۷۵ و ۳۷/۵ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. براساس آنالیز آماری مشخص گردید میان غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و همچنین ۱۸/۷۵ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما میان غلظت‌های ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. برای باکتری گرم مثبت *لیستریا اینوکوا* در تمامی غلظت‌ها به جز غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۵ درصد مشاهده نشد.

جدول ۱- میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ شیشه‌شور به روش انتشار در دیسک بر باکتری‌های بیماری‌زا

Table 1- Mean inhibition zone diameters (mm) silver nanoparticles biosynthesized by Callistemon citrinus leaf extract by disk diffusion method of pathogenic bacteria

Concentration(mg/ml)				Bacteria
150	**75**	**37/5**	**18/75**	
8.75 ± 0.25^{Ba}	7.50 ± 0.50^{Cb}	7.25 ± 0.75^{Bb}	6.75 ± 0.25^{BCb}	***Escherichia coli***
13.00 ± 0.05^{Aa}	11.00 ± 1.00^{Ab}	8.50 ± 0.50^{Ac}	7.50 ± 0.50^{Ac}	***Pseudomonas aeruginosa***
12.00 ± 1.00^{Aa}	9.00 ± 1.00^{Bb}	7.50 ± 0.50^{Bc}	7.50 ± 0.50^{ABc}	***Salmonella typhi***
8.05 ± 0.05^{Ba}	8.00 ± 0.50^{BCa}	6.75 ± 0.25^{Bb}	6.25 ± 0.25^{Cb}	***Staphylococcus aureus***
8.25 ± 0.25^{Ba}	7.25 ± 0.25^{Cb}	7.00 ± 0.50^{Bb}	6.75 ± 0.25^{BCb}	***Listeria innocua***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=۳) گزارش شده‌اند.

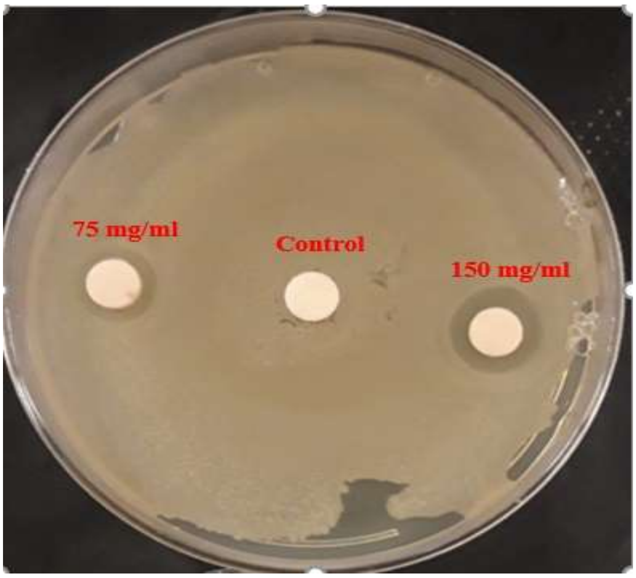
حروف غیر مشابه کوچک (a، b و c) در یک ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ میان غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره است.

حروف غیر مشابه بزرگ (A، B وC) در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ میان باکتری‌های مختلف است.

Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3

Different letters (a, b and c) in each row show a significant difference at $P< 0.05$ between different concentrations of silver nanoparticles.

Different letters (A, B and C) in each column show a significant difference at $P< 0.05$ between different bacteria.



شکل ۳- اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بر سودوموناس آئروژینوزا به روش انتشار در دیسک در غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر.

Fig. 3. Antimicrobial effect of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa by disk diffusion at concentrations of 75 and 150 mg/ml.

جدول ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ شیشه‌شور به روش چاهک آگار بر باکتری‌های بیماری‌زا

Table 2- Mean inhibition zone diameters (mm) silver nanoparticles biosynthesized by Callistemon citrinus leaf extract by well diffusion agar method of pathogenic bacteria

Concentration(mg/ml)				Bacteria
150	75	37/5	18/75	
7.00±0.50^Ba^	6.75±0.25^ABa^	6.50±0.50^Aa^	–	***Escherichia coli***
7.75±0.25^Aa^	7.25±0.20^Ab^	6.75±0.35^Ab^	–	***Pseudomonas aeruginosa***
7.00±0.50^Ba^	6.75±0.25^ABa^	6.40±0.10^Aa^	–	***Salmonella typhi***
6.75±0.25^Ba^	6.50±0.50^Ba^	6.25±0.55^Aa^	–	***Staphylococcus aureus***
7.75±0.25^Aa^	6.75±0.25^ABb^	6.40±0.10^Ab^	–	***Listeria innocua***

نتایج به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" سه تکرار (n=۳) گزارش شده‌اند.

حروف غیر مشابه کوچک (a، b و c) در یک ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ میان غلظت‌های مختلف نانو ذرات نقره است.

حروف غیر مشابه بزرگ (A، B وC) در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ میان باکتری‌های مختلف است.

Values are expressed as mean ±standard deviations, n = 3

Different letters (a, b and c) in each row show a significant difference at P< 0.05 between different concentrations of silver nanoparticles.

Different letters (A, B and C) in each column show a significant difference at P< 0.05 between different bacteria.

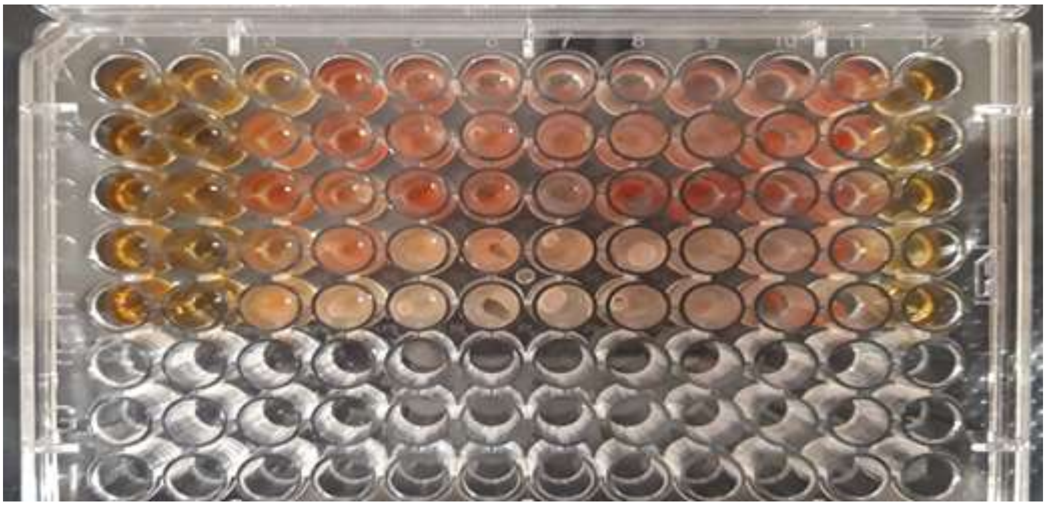
در شکل ۲، نمایی از اثر نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه شیشه‌شور بر باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* آورده شده است. نتایج بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ گیاه شیشه‌شور به روش چاهک آگار بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد ذرات نانو نقره بیوسنتری در غلظت ۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر هیچ کدام از سویه‌های میکروبی بیماری‌زا اثر بازدارندگی از خود نشان نداد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که میان تمامی غلظت‌های نانو ذرات نقره سنتز شده برای باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سالمونلا تیفی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که میان غلظت‌های ۳۷/۵ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های *سودوموناس ائروژینوزا* و *لیستریا اینوکوا* اختلاف معنی‌داری وجود ندارد در حالی که میان غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌درای در سطح ۵ درصد مشاهده شد.

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره برگ گیاه شیشه‌شور بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *سالمونلا تیفی* و *لیستریا اینوکوا* به‌ترتیب ۱۲۸، ۲۵۶، ۲۵۶، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی برای تمامی سویه‌های بیماری‌زا نیز بزرگتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در شکل ۳، نمایی از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد نانو ذرات نقره سنتز شده بر سویه‌های میکروبی نشان داده شده است.

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ شیشه‌شور بر باکتری‌های بیماری‌زا

Table 3- Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) silver nanoparticles biosynthesized by Callistemon citrinus leaf extract of pathogenic bacteria

MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	Bacteria
>512	128	***Escherichia coli***
>512	256	***Staphylococcus aureus***
>512	256	***Pseudomonas aeruginosa***
>512	256	***Salmonella typhi***
>512	512	***Listeria innocua***



شکل ٤- نمایی از تعیین حداقل غلظت بازدارندگی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده توسط عصاره برگ شیشه‌شور به روش میکرودایلوشن براث بر باکتری‌های بیماری‌زا.

Fig. 4. The MIC of silver nanoparticles biosynthesized by Callistemon citrinus leaf extract by microdilution broth method

در این پژوهش از عصاره گیاه شیشه‌شور جهت سنتز نانو ذرات نقره به روش احیای زیستی استفاده شد. گیاه شیشه‌شور حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، فنولی و فلاونوئیدی فراوانی می‌باشد (Sosani Gharibvand *et al*., 2020). این ترکیبات در احیای یون‌های فلزی و تبدیل آن‌ها به نانو ذرات فلزی نقش مهمی دارند (Azizian Shermeh *et al*., 2017). در اثر برهمکنش عصاره گیاه با محلول نیترات نقره رنگ محلول واکنش به رنگ مایل به قرمز تغییر رنگ داد این تغییر رنگ اولین نشانه از سنتز نانو ذرات نقره محسوب می‌شود و با نتایج سایر پژوهشگران مشابه بود (Tolouietabar and Hatamnia *et al*., 2017). تغییر رنگ مربوط به پدیده پلاسمون رزونانس سطحی (Surface Plasmon Resonance) می‌باشد که به القای الکترون آزاد در نانو ذرات نسبت داده می‌شود (Paosen *et al*., 2017). طیف مرئی- فرابنفش نشان داد در طول موج ۴۳۰ نانومتر افزایش ارتعاشات پلاسمون سطحی اتفاق افتاد. وجود پیک نانو ذرات نقره در طول موج ۴۳۰ نانومتر با نتایج سایر پژوهشگران همخوانی داشت (Dousti *et al*., 2019 ; Kavoosi and Yaghoubi., 2017).

فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده بر پنج سویه میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد نانو ذرات در غلظت‌های به‌کار رفته دارای اثرات ضدمیکروبی متفاوت می‌باشد. اثر مهارکنندگی نانو ذرات نقره بر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت بیشتر بود. نانو ذرات با مکانیسم‌های مختلفی از جمله تداخل در سنتز دیواره سلولی، مهار سنتز پروتئین، تداخل در سنتز نوکلئیک اسید و مهار مسیرهای متابولیکی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی عمل کنند (Guzman *et al*., 2012; Dhand *et al* 2016). مطالعاتی که توسط طیف سنجی رزونانس چرخش الکترونی، انجام شده است، نشان می‌دهد تماس نانو ذرات نقره با میکروارگانیسم‌ها، منجر به آزاد شدن رادیکال‌های آزاد می‌شود. رادیکال‌های آزاد توانایی آسیب رساندن به غشا سلولی و ایجاد اختلال در آن را دارند و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شوند. همچنین مطرح شده است یون‌های نقره با گروه تیول بسیاری از آنزیم‌های حیاتی در تعامل می‌باشند و آن‌ها را غیرفعال می‌کنند. یون نقره از طریق دیواره سلولی به باکتری نفوذ کرده و در نتیجه با پارگی دیواره سلولی منجر به دناتوره شدن پروتئین و مرگ سلول باکتریایی می‌شود. همچنین نانو ذرات می‌توانند انتقال سیگنال در باکتری را تعدیل کنند. این واقعیت به اثبات رسیده است که فسفریلاسیون بسترهای پروتئین در باکتری، انتقال سیگنال‌های باکتریایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. دفسفریلاسیون فقط در باقی‌مانده تیروزین باکتری‌های گرم منفی مشاهده می‌شود. مشخصات فسفو تیروزین پپتیدهای باکتریایی، توسط نانو ذرات تغییر می‌کند و همچنین نانو ذرات، بسترهای پپتیدی را روی باقی مانده‌های تیروزین دفسفریله می‌کنند که این امر منجر به مهار انتقال سیگنال و در نتیجه توقف رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Prabhu and Poulose, 2012; Arokiyaraj *et al*., 2014).

Azizian Shermeh و همکاران (۲۰۱۷)، اثر ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره آبی گیاه آقطی (*Sambucus ebulus* L.) را بر *استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار دادند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که نانو ذرات نقره بیشترین تاثیر را روی باکتری *اشرشیاکلی* با قطر هاله عدم رشد ۲۲ میلی‌متر و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین تاثیر را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ۲۵

میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند. در پژوهش حاضر نیز باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌ترین باکتری بود. نتایج یافته‌های مطالعه حاضر با این پژوهشگران همخوانی داشت. Mafakheri. و همکاران (۲۰۱۷) اثرضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده توسط عصاره متانولی میخک هندی را بر باکتری *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را به روش چاهک در آگار مورد ارزیابی قرار دادند. قطر هاله عدم رشد در غلظت ۵۰ میکرولیتر نانو ذرات برای باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به ترتیب ۶، ۱۰/۵ و ۱۰/۷۵ میلی‌متر محاسبه شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد، نانو ذرات نقره حاصل از عصاره متانولی میخک روی هر دو گونه باکترهای گرم مثبت و گرم منفی اثر باکتریوسیدی داشت، با این وجود باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* حساسیت بیشتری از باکتری گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* نشان داد و هاله عدم رشد بزرگتری ایجاد کرد. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که باکترهای گرم منفی دارای قطر هاله عدم رشد بیشتری نسبت به باکترهای گرم مثبت بودند.

Haji Rostamloo و همکاران (۲۰۱۹) اثر ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره مریم گلی بر *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفی موریوم* را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد، مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد در برابر پاتوژن‌های آزمایشی در محدوده ۶/۲۵-۳/۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. *لیستریا مونوسیتوژنز* با بالاترین مقدار حداقل غلظت بازدارندگی از رشد، کمترین حساسیت را در بین باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد. حداقل غلظت کشندگی برای تمامی باکتری‌ها ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود . Karamian و همکاران (۲۰۱۹) اثر ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره آبی بذره زیره سبز بر باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* را به روش انتشار در دیسک مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد، نانو ذرات نقره سنتز شده فعالیت ضدمیکروبی بیشتری در برابر باکتری‌های گرم منفی داشتند و باکتری‌های گرم مثبت در برابر نانو ذرات نقره مقاومت نشان داده و مقاوم‌ترین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. در پژوهش حاضر نیز *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌ترین میکروارگانسیم بود. نتایج یافته‌های مطالعه حاضر با این پژوهشگران همخوانی داشت.

Suddin و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ *Callistemon viminlis* بر *کلبسیلا پنومونیه*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد نمونه سوم با اندازه متوسط ۱۲ نانومتر دارای قوی‌ترین اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های مورد آزمایش بود (حداقل غلظت بازدارنده از رشد ۱۰/۶۱ و حداقل غلظت کشندگی ۲۱/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر). نانو ذرات نقره در تمامی نمونه‌ها بر باکتری‌های گرم منفی اثر مهاری بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت داشت. در مطالعه حاضر نیز فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بر باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود.

Ahluwalia و همکاران (۲۰۱۷) سنتز نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره گیاه *سارتری پانیکولاتا* و فعالیت ضدمیکروبی آن را بر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج به‌دست آمده نشان داد اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بر *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر هاله عدم رشد ۱۸/۸۰ ±۰/۷۲ میلی‌متر بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۱۴/۶۷ ±۰/۳۵ میلی‌متر بود. باکتری‌های گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* و *کلبیسلا پنومونیه* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌تر بود. در پژوهش ما نیز اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر بیشتر از سایر باکتری‌ها بود. نتایج یافته‌های مطالعه حاضر با این پژوهشگران همخوانی داشت. Paosen و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ گیاهان خانواده Myrtaceae را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر باکتری‌های *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسینتوباکتربوئومانی*، *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب بین ۶۲/۵-۷/۸ و ۱۲۵-۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. Erjaee و همکاران (۲۰۱۷) اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره *Chamaemelum nobile* را بر *اشرشیاکلی*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* مورد بررسی قرار دادند. قطر هاله عدم رشد به‌ترتیب ۱۵/۱، ۱۴/۳، ۱۳ و ۱۴/۳ میلی‌متر و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی نیز به‌ترتیب ۷/۸، ۷/۸، ۳۱/۲ و ۱۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شد. نتایج نشان داد فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بر باکتری‌های گرم منفی (*اشرشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم*) نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس*) بیشتر بود. نتایج یافته‌های مطالعه حاضر با این پژوهشگران همخوانی داشت.

Larayetan و همکاران (۲۰۱۹) اثر ضدمیکروبی نانو ذرات سنتز شده از عصاره برگ *Callistemon citrinus* را بر گروهی از باکتری‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد نانو ذرات سنتز شده از قسمت گل گیاه در غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین فعالیت بازدارندگی را علیه *اشرشیا کلی* و کمترین فعالیت بازدارندگی را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. اختلافات مشاهده شده در خواص ضدمیکروبی نانو ذرات نقره مختلف سنتز شده ممکن است به دلیل تغییر در ترکیبات شیمیایی قسمت‌های مختلف گیاه همراه با برخی از ترکیبات فعال زیستی مانند آلکالوئیدها، تانن‌ها، ترپنوئیدها، اتر و ترکیبات فنلی مانند فلاونوئیدها باشد. در مطالعه حاضر نیز کمترین اثر

بازدارندگی در روش انتشار در دیسک و چاهک آگار بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. Behravan و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات نقره را در غلظت‌های (۱، ۳ و ۵ میلی‌مولار) را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* به روش انتشار در دیسک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج به‌دست آمده نشان داد اثر ضدمیکروبی نانو ذرات نقره بر باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود که با افزایش غلظت و تعداد نانو ذرات، مهار کامل رشد باکتری اتفاق افتاد. در باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* نانو ذرات نقره مانع از جذب و آزاد شدن فسفات، مانیتول، پرولین، گلوتامین و سوکسینات از سلول این باکتری می‌شوند تمایل زیاد ذرات نقره به گوگرد و فسفر در غشای سلولی دلیل اصلی خاصیت ضدباکتریایی آن است. نانو ذرات نقره با پروتئین‌های حاوی گوگرد در داخل یا خارج غشای سلول واکنش می‌دهند که بر بقای سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. نتایج یافته‌های مطالعه حاضر با این پژوهشگران همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره برگ گیاه شیشه‌شور از توانایی مناسبی جهت سنتز نانو ذرات نقره برخوردار می‌باشد. نانو ذرات سنتز شده از برگ گیاه شیشه‌شور فعالیت ضدمیکروبی مناسبی بر باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه باکتری‌های گرم منفی داشت. نانو ذرات سنتز شده به روش سبز می‌توانند به‌عنوان ماده ضدمیکروبی جهت مبارزه با بیماری‌های عفونی ناشی از سویه‌های مختلف میکروبی استفاده شود، هر چند در ادمه لازم است پژوهش‌های گسترده‌تری در شرایط آزمایشگاهی، مدل حیوانی و درون‌تنی انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H., & Samiei, M., (2016). Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, *42*(2), 173-180. https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.912200
2. Ahluwalia, V., Elumalai, S., Kumar, V., Kumar, S., & Sangwa, R. S., (2018). Nano silver particle synthesis using *Swertia paniculata* herbal extract and its antimicrobial activity. *Microbial Pathogenesis*, 114, 402-408. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.052
3. Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., Tabatabaei Yazdi, F. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of Pseudomonas aeruginosa in Frankfurter sausage containing Satureja bachtiarica extracts. *Microbial Pathogenesis*, *85*,58-65. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.06.003
4. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., Falah, F. (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences,13(1)*, 875-83. https://doi.org/10.5219/1226
5. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, SA., Zendeboodi, F., Gholian, MM., Vasiee, A. (2013). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences, 4(3)*, 89-99. https://doi.org/10.22037/jps.v4i3.4666
6. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Noorbakhsh, H., Riazi, F., Jajarmi, A., Tabatabaei Yazdi, F. (2016). Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Myrtus communis* on pathogenic strains causing infection. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 18(2), e5989. doi: 10.17795/zjrms-5989
7. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Riazi, F. (2016). Antifungal Effect of the Aqueous and Ethanolic *Avicennia marina* Extracts on *Alternaria citri* and *Penicillium digitatum*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, *18*(2), e5992. doi: 10.17795/zjrms-5992
8. Arokiyaraj, S., Arasu, MV., Vincent, S., Prakash, NU., Choi, SH., Oh, YK., Choi, KC., & Kim, KH., (2014). Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum L* and its antibacterial and cytotoxic effects: an in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 379-378.
9. Azizian Shermeh, O., Valizadeh, J., Noroozifar, M., & Qasemi, A., (2016). Investigating the Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles Biosynthesized by Aqueous Extract of Sambucus ebulus L. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 24(5), 92-108. [In Persian].
10. Balasundaram, A., Ragupathy, R., Sankar, S., Thiyagarajan, M., Ravi, L., Karuppasamy, R., & Veerappapillai, S., (2016). Investigation of Phytocompounds and Computational Approach for the Evaluation of Therapeutic Properties of Ethanolic Leaf Extract of *Callistemon citrinus*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(1), 110-116.DOI: 10.2147/IJN.S53546

11. Behravan, M., Panahi, AH., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R., & Mirzapour, A., (2019). Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 148-54. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.101
12. Dehghan Nayeri, F., Mirhosseini, M., Mafakheri, S., & Zarrabi, MM., (2018). Antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by the aqueous extract of sesame (*Sesamum indicum L*.). *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(1), 16-26. [In Persian].
13. Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D., & Sreedhar, B., (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Coffea arabica* seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 36-43. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.018
14. Dolatabadi, S., Emrani, S., Mehrafruz, E., & Zhiani, R., (2017). Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Eucalyptus camaldulensis. Journal of Neyshabur University of Medical Sciences*, 5(3), 74-85. [In Persian].
15. Dousti, B., Nabipour, F., & Hajiamraei, A., (2019). Green synthesis of silver nanoparticle by using the aqueous extract of *Fumaria Parviflora* and investigation of their antibacterial and antioxidant activities. *Razi Journal of Medical Sciences*, 26(6), 105-117. [In Persian].
16. Emrani, Sh., Zhiani, R., & DafeJafari, M., (2018). The Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Plants of *Glycyrrhiza glabra* and *Mentha Piperata* and Its Antimicrobial Effect on Some Bacterias That Cause Tooth Decay. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 16(10), 953-968. [In Persian].
17. Erjaee, H., Rajaian, H., & Nazifi, S., (2017). Synthesis and characterization of novel silver nanoparticles using *Chamaemelum nobile* extract for antibacterial application. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(2), 1-9.
18. Gomathi, M., Rajkumar, PV., Prakasam, A., & Ravichandran, K., (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Datura stramonium* leaf extract and assessment of their antibacterial activity. *Resource-Efficient Technologies*, 3(3), 280-4. https://doi.org/10.1016/j.reffit.2016.12.005
19. Guzman, M., Dille, J., & Godet, S., (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(1), 37-45. https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007
20. Haji Rostamloo, B., Zhiyani, R., Omrani, Sh., (2019). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Salvia officinalis* Extract and Evaluation of their Antioxidant and Antimicrobial Activity Against Bacteria of Food Corruption. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 11(2), 107-118. [In Persian].
21. Karamian, R., & Kamalnejade, J., (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous seed extract of *Cuminum cyminum L.* and evaluation of their biological activities. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 10;26(5), 128-41. [In Persian].
22. Kavoosi, S., & Yaghoubi, H., (2017). Synthesis of silver nanoparticles using green method of plant extract European marjoram (*Origanum majorana*) and their antibacterial effects. *Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biolohy)*, 30(2), 161-173. [In Persian].
23. Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety 40(3)*, e12782. https://doi.org/10.1111/jfs.12782
24. Larayetan, R., Ojemaye, MO., Okoh, OO., & Okoh, AI., (2019). Silver nanoparticles mediated by *Callistemon citrinus* extracts and their antimalaria, antitrypanosoma and antibacterial efficacy. *Journal of Molecular Liquids*, 273, 615-625. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.10.020
25. Larayetan, R., Ololade, ZS., Ogunmola, OO., & Ladokun, A., (2019). Phytochemical Constituents, Antioxidant, Cytotoxicity, Antimicrobial, Antitrypanosomal, and Antimalarial Potentials of the Crude Extracts of *Callistemon citrinus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 28, 1-14. https://doi.org/10.1155/2019/5410923
26. Mabhiza, D., Chitemerere, T., & Mukanganyama, S., (2016). Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from *Callistemon citrinus* and Vernonia adoensis against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 1-7. http://dx.doi.org/10.1155/2016/6304163
27. Mafakheri, S., Dehghan Nayeri, F., & Mirhoseini, M., 2017. Study the biological production and antibacterial and antifungal effects of silver nanoparticles synthesized by the methanolic extract of clove (*Syzygium aromaticum*). *Modares Journal of Biotechnology*, 8(3), 110-120. [In Persian].
28. Mahadevan, S., Vijayakumar, S., & Arulmozhi, P., (2017). Green synthesis of silver nano particles from *Atalantia monophylla* (L) Correa leaf extract, their antimicrobial activity and sensing capability of H2O2. *Microbial Pathogenesis*, 113, 445-450. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.029
29. Nayak, D., Ashe, S., Rauta, PR., Kumari, M., & Nayak, B., (2016). Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 44-52. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.022

30. Nikbakht, M., & Pourali, P., (2015). Survey of biological and antibacterial effects of silver nanoparticles of aqueous and methanol extracts of *Berberis Vulgaris*. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity Tehran Medical*, 25 (2), 112-118.
31. Panacek, A., Kvitek, L., Smekalova, M., Vecerova, R., Kolar, M., Roderova, M., Dycka, F., Sebela, M., Prucek, R., Tomanec, O., & Zboril, R., (2018). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65-71. https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y
32. Paosen, S., Saising, J., Septama, AW., & Voravuthikunchai, SP., (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using plants from Myrtaceae family and characterization of their antibacterial activity. *Materials Letters*, 209, 201-6. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.07.102
33. Pirtarighat, S., Ghannadnia, M., & Baghshahi, S., (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using the plant extract of *Salvia spinosa* grown in vitro and their antibacterial activity assessment. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9(1), 1-9. https://doi.org/10.1007/s40097-018-0291-4
34. Prabhu, S., & Poulose, EK., (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(32), 2-10. https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32
35. Rafique, M., Sadaf, I., Tahir, MB., Rafique, MS., Nabi, G., Iqbal, T., & Sughra, K., (2019). Novel and facile synthesis of silver nanoparticles using *Albizia procera* leaf extract for dye degradation and antibacterial applications. *Materials Science and Engineering C*, 99, 1313-1324. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.059
36. Rajeshkumar, S., & Bharath, LV., (2017). Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles–a review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chemico-Biological Interactions*, 273, 219-27. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.019
37. Rasheed, T., Bilal, M., Iqbal, HM., & Li, Ch., (2017). Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 408-415. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.020
38. Rolim, WR., Pelegrino, MT., De Araujo Lima, B., Ferraz, LS., Costa, FN., Bernardes, JS., Rodigues, T., Brocchi, M., & Seabra, AB., (2019). Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*, 463, 66-74. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203
39. Singh, P., Kim, YJ., Singh, H., Wang, C., Hwang, KH., Farh, ME., & Yang, DC., (2015). Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2567-2577. DOI:10.2147/IJN.S72313
40. Sosani Gharibvand, Z., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Jooyandeh, H., (2020). Investigation of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of *Callistemon Citrinus* Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 19(5), 463-84. [In Persian]. DOI:10.29252/jrums.19.5.463
41. Suddin, R., & Akrema., (2016). Extracellular synthesis of silver dimer nanoparticles using *Callistemon viminalis* (bottlebrush) extract and evaluation of their antibacterial activity. *An International Journal for Rapid Communication*, 49(4), 268-75. https://doi.org/10.1080/00387010.2016.1140654
42. Sureshjani, M. H., Tabatabaei Yazdi, F. Mortazavi, S. A., Alizadeh Behbahani, B., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of Kelussia odoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro”. *Journal of Paramedical Sciences*, *5*(2), 115-120. https://doi.org/10.22037/jps.v5i2.5943
43. Tolouietabar, H., & Hatamnia, AA., (2017). Investigation of antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized from *Scrophularia striata* fruit extract. *Journal of Cell & Tissue*, 8(2), 206-213. [In Persian].
44. Yeganegi, M., Tabatabaei Yazdi, F. Mortazavi, S. A., Asili, J., Alizadeh Behbahani, B., & Beigbabaei, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial Pathogenesis, 116*, 62-67.https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.014